

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Herman Proosa

**PepFectide nukleiinhapete nanokomplekside ultrastruktuuri kirjeldus
transmissioonelektronmikroskoopiaga**

Bakalaureusetöö

Juhendajad doktorant Carmen Juks, M.Sc

prof. Margus Pooga, Ph.D

TARTU 2014

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Nukleiinhapped ja nende geeniregulatsiooni mehhanismid	7
1.2 Nukleiinhapete rakkuviimise meetodid	8
1.3 Rakku sisenevad peptiidid.	10
1.4 RSPde rakku sisenemise mehhanismid.....	12
1.5 Transportaan ja PepFect-id	13
1.5.1 Transportaan ja TP10.....	13
1.5.2 PepFect tehnoloogia	14
1.5.3 PepFect 3	14
1.5.4 PepFect 6	15
1.5.5 PepFect 14	16
1.6 Polüetüleenglükool ja PEGüleerimine	17
2 EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja metoodika	18
2.2.1 Kasutatud nukleiinhapped ja rakku sisenevad peptiidid.....	18
2.2.2 pDNA-PF14 ja siRNA-PF6 nanokomplekside moodustamine	18
2.2.3 Transmissioonelektronmikroskoopia.....	19
2.2.4 Kvantitatiivne analüüs	19
2.3 Tulemused.....	19
2.3.1 PF14-pDNA nanokomplekside suurus ja morfoloogia	20
2.3.2 PF6-siRNA nanokomplekside suurus ja morfoloogia	20

2.3.3	PEGüleeritud-PF14 mõju PF14-pDNA ja PF6-siRNA vaheliste nanokomplekside moodustumisele.....	21
2.4	Arutelu	26
	KOKKUVÕTE	30
	SUMMARY	31
	KIRJANDUSE LOETELU.....	32
	Tänuavaldused	36
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	37

KASUTATUD LÜHENDID

ON	oligonukleotiid
PEG	polüetüleenglükool
PF6	PepFect 6
PF14	PepFect 14
QN	trifluorometüülkinoon
RNAi	RNA interferents
RSP	rakku sisenev peptiid
siRNA	lühike interfereeriv RNA (small interfering RNA)
TEM	transmissioonelektronmikroskoopia
TP10	Transportaan 10

SISSEJUHATUS

Geeniteraapia all mõistetakse tavaliselt transgeeni ekspressiooni, eesmärgiga kompenseerida vigase geeni mõju või sünteesida rakus kasulikku valku. Viimase tosina aasta jooksul on erinevate molekulaarsete protsesside avastamise ning uute meetodite ja vektorite väljatöötamise tulemusena geeniteraapia võimalused oluliselt avardunud, tuues transgeeni ekspressiooni kõrvale mitu kõrge potentsiaaliga terapeutilistel oligonukleotiididel põhinevat meetodit, nagu geenivaigistamine ning splaissimise modulatsioon.

Sõltumata meetodist on geeniteraapia rakendamisel kriitilise tähtsusega terapeutilise nukleiinhappe ohutu ja efektiivne transfektsioon rakkudesse või kudedesse. Nukleiinhapped ei ole tänu suurele molekulmassile ja negatiivse laengule võimalised iseseisvalt rakumembraani läbima, mistõttunende transportimiseks rakkudesse on vaja kasutada transportvektoreid. Lisaks ohutule ja efektiivsele transfektsioonile on tavaliselt tähtis ka transportsüsteemi hea spetsiifilisus raku tüübi suhtes ning nukleiinhappe mõju avaldumine pikema perioodi vältel.

Hetkel on meditsiinirakendused piiratud enamjaolt viirusepõhiste vektorite kasutamisega, ent sellega kaasneb mitmeid puudusi: inimorganism on kohastunud võitlema organismi sattunud viiruste vastu, mis vähendab seda tüüpi geeniteraapia efektiivsust. Immunogeensuse ja organismi antikehade sünteesi tõttu ei ole võimalik patsienti sama viirusvektoriga korduvalt transfekteerida, mis on aga probleemiks, sest geeniteraapia kordamine on reeglina vajalik.

Viirustel põhinevate vektorite probleemide tõttu on pikema aja jooksul püütud leida mitteviiruslike alternatiive, mis on osutunud kas väheefektiivseks või liialt toksiliseks. Viimasel ajal on uurimissuunas tehtud edasiminekuid ning kasutada on mitmed uusi vektoreid, mis suudavad transfektsioonivõime poolest konkureerida viiruslike vektoritega.

Neist ühed huvipakkuvamad on rakku sisenevad peptiidid (RSPd). RSPd on kaasaegsed transportvektorid, mis sarnaselt katioonsetele lipiididele ja polümeeridele komplekseeruvad nukleiinhapetega elektrostaatilise vastastikmõju tõttu. RSP-põhiste süsteemide füüsikaliskemilised omadused on küllaltki mitmekesised, mis võimaldab RSPde abil rakkudesse transportida väga erineva suuruse ja funktsiooniga terapeutilisi molekule.

RSPde korral on efektiivselt rakendatud ratsionaalse disaini põhimõtet, võimendades RSPde kasulikke omadusi, suurendades ühelt poolt nende nukleiinhapete nanokomplekside vastupidavust vereseerumi valkude ja proteaaside suhtes ning teiselt poolt parandades nende võimet siduda erinevat tüüpi nukleiinhappeid. Selleks, et osata efektiivsemalt disainida uusi ja

paremaid RSPsid, on lisaks funktsionaalsusele oluline mõista ka RSP ja nukleiinhappe vahel moodustuvate nanopartiklite suurust ja kuju.

Käesoleva tööeesmärgiks on iseloomustada erinevate PepFectide ja oligonukleotiidide vahel moodustunud nanokomplekside morfoloogiat ultrastruktuuri tasemel transmissioon-elektronmikroskoopiaga.

Märksõnad: rakku sisenevad peptiidid, morfoloogia, transmissioonelektronmikroskoopia, oligonukleotiidid, polüetüleenglükool.

1 KIRJANDUSEÜLEVAADE

1.1 Nukleiinhapped ja nende geeniregulatsiooni mehhanismid

Plasmiidse DNA (pDNA) kasutamine on geeniteraapia vanim ja enimuuritud meetod, mis põhineb terapeutiliste transgeenide viimises bakteriaalse päritoluga vektorisse (Scholz & Wagner 2012). pDNA koosseisus rakku viidud geeniga on võimaliktaastada vigaste geenide ekspressioon ja sellelt toodetava valgus hulk või hoopiski inhibeerida mitesobivaid geene. Sealjuures võib pDNAkoosseisus rakku viidud geen siseneda genoomi või jääda tuuma ilma genoomi integreerumata (Wang *et al.*, 2013).

Oligonukleotiidide (ON), nagu siRNA, miRNA, antisens-ONde kasutamine geeniekspressiooni muutmiseks on väga populaarne ja jätkuvalt kasvav geeniteraapia valdkond. Oligonukleotiididel põhinevad meetodid jagunevad geeniregulatsioonimehhanismi poolest põhimõtteliselt väga erinevateks strateegiateks: mRNA ensümaatilisel lagundamisel põhinevad RNA interferents ja antisens oligonukleotiidid ning steeriliselt blokeerivad oligonukleotiidid (Kole *et al.*, 2012).

RNA interferents (RNAi) ehk geenide vaigistamine põhineb 20 – 21 nukleotiidi pikkustel lühikestel interfereerivatel RNAde ehk siRNAde. RNA interferentsi võib sisuliselt jagada kaheks üksteisele järgnevaks protsessiks, kus esmalt loigatakse enamasti eksogeenset päritolu kaheaahelaline dsRNA Dicer ensüümi poolt lühikesteks siRNA juppideks (Wilson *et al.*, 2013). Teises etapis seotakse siRNA molekulid raku tsütoplasmas asuvale RNA indutseeritud vaigistuskompleksile ehk RISC kompleksile, mille tulemusena siRNA ahelad lahutatakse teineteisest. Seejärel seondub RISC kompleksi koosseisus olev siRNA komplementaarsetele järjestustele, millele järgneb mRNA ensümaatiline lagundamine RISCi katalüütilise komponendi Argonaut2 poolt. Endogeenselt kasutab organism RNA interferentsi võitluses patogeense päritoluga RNAde vastu. Kõigist antisens-meetodite oligonukleotiididest on võimalused siRNA molekulide modifitseerimiseks ja seetõttu nende terapeutiliste omaduste parandamiseks kõige piiratumad, sest RISC kompleks ei ole suuteline suuremal määral modifitseeritud peptiidide ära tundma (Kole *et al.*, 2012). Lisaks siRNAle võib RNA interferents kasutada ka endogeense päritoluga üheaahelalisi miRNAsid ehk mittekodeerivaid RNAsid (Wilson *et al.*, 2013).

Antisens oligonukleotiidid (ASO) on üheaahelalised ligikaudu 20 nukleotiidi pikkused DNA või RNA molekulid, mis on komplementaarsed oma mRNA sihtmärkjärjestusega.

Seondumisel komplementaarsetele järjestusele tekivad DNA-RNA dupleksid, mille tunneb ära mittespetsiifiline endonukleas RNAas H, mis teeb RNA-ahelasse katke ning lagundab sihtmärk-RNA. Normaalselt kasutab organism RNAas H-i näiteks pöördtranskriptsioonil RNA-põhise maatriksi lagundamiseks komplementaarset DNA ahela sünteesi järel. ASOid on märksa ulatuslikumalt modifitseeritavad kui siRNA molekulid, kuna RNAas H on ON struktuuri erisuste suhtes oluliselt vähem tundlik. Oligonukleotiidide vastupidavuse parandamiseks eksonukleaside suhtes on ASOid modifitseeritud mitmeti, näiteks on fosfodiesteridemed nukleosiidide vahel asendatud fosforotioaatsidemetega (PS) (Hoke *et al.*, 1991). Selline modifikatsioon parandab oluliselt oligonukleotiidide vastupidavust vereseerumi valkudele, kuid samas on näidatud selliste molekulidemadalamat afiinsust RNA suhtes (Brown *et al.*, 1994). Lisaks PS lisamisele, on ASOde kummalgi küljel asetsevad 5 nukleotiidi täiendavalt modifitseeritud riboosi metüleerimise läbi, mis parandab oluliselt nende vastupidavust nukleaside suhtes (Kurreck, 2003; Dean & Bennett, 2003; Kole *et al.*, 2012).

Steeriliselt blokeerivad oligonukleotiidid (SBO), erinevalt eelpool mainitud meetoditest, ei indutseeri ensüümide vahendatud mRNA lagundamist, vaid seondudes komplementaarsetele järjestusele, takistavad raku masinavärgi normaalset toimimist, näiteks splaissosoomi seondumist sihtmärk-mRNA või sihtmärk-pre-mRNA järjestusele. Sõltuvalt sihtmärkjärjestuse funktsioonist, on taoliste molekulide abil võimalik blokeerida mRNA translatsiooni, muuta RNA sekundaarstruktuuri ning moduleerida pre-mRNAde alternatiivset splaissimist. SBO-de alla kuuluvaid splaissimist ümbersuunavaid oligonukleotide (SSO, Splice Switching Oligonucleotide) on väga edukalt kasutatud erinevates Duchenni lihasdüstroofia mudelites nii *in vitro* kui *in vivo* (Yin *et al.*, 2008; Moulton & Moulton, 2010; Touznik *et al.*, 2014; Kole *et al.*, 2012).

1.2 Nukleiinhapete rakkuviimise meetodid

Nukleiinhapetel põhinevate molekulide kasutusala nii meditsiinis kui biotehnoloogias on väga lai, kuid nende efektiivset kasutamist piiravad mitmed asjaolud. Nukleiinhapete vaba liikumine rakku on takistatud nende suure molekulmassi ja negatiivse laengu poolt, mistõttu on hakatud otsima efektiivseid transfektsioonimeetodeid, mis oleksid võimelised viima oligonukleotide rakkudesse ning tagama nende bioloogilise aktiivsuse.

Transfektsioonimeetodid võib võib sisuliselt jagada kaheks: viirulikud ja mitteviirulikud meetodid. Viiruslikest vektoritest on enim kasutatud retroviirusi, lentiviirusi, adenoviirusi ja adeno-assotsieerunud viirusi (Zhang and Godbey, 2006). **Viiruslikke** transportsüsteeme

iseloomustab üldjuhul kõrge transfektsiooniefektiivsus ning pika-ajaline geeniekspressioon, kuid sageli ka toksilisus, immunogeensus, mutageensus, kehv raku-spetsiifilisus, piiratud lastmolekuli kandevõime ning kõrgem hind (Wang *et al.*, 2013). Selleks, et vähendada võimalikku toksilist mõju organismile, on viiruslike transfektsioonireagentide kõrvale leitud mitmeid alternatiive. Mitteviiruslikud meetodid võib omakorda jagada kaheks: mehhaanilised meetodid ning keemilised meetodid. **Mitteviiruslikke** transportsüsteeme iseloomustab nende suhteline ohutus, madalam toksilisus ja võime kanda suuri lastmolekule, kuid samas on täheldatud madalamat transfektsiooniefektiivsust ning nõrgemat transgeenide ekspressiooni, võrreldes viiruslike vektoritega (Wang *et al.*, 2013).

Tuntumad **mehhaanilised meetodid** on mikrosüstimine, geenipüss ja elektroporatsioon.

Mikrosüstimine on mikroskoopiline meetod, kus huvipakkuv nukleiinhape viiakse mikropipeti ja mikrosuuruses nõela abil (diameeter 0,5 – 5 µm) otse raku tsütoplasmasse või rakutuuma. Mikrosüstimine on lihtne ja odav meetod, mis võimaldab efektiivset transfektsiooni ka suurte nukleiinhappe koguste juures, omamata seejuures toksilisi kõrvalmõjusid. Põhiline probleem seisneb meetodi ruumilises piiratuses, sest rakke tuleb transfekterida üksikhaaval (Wang *et al.*, 2013). **Geenipüss** ehk ballistiline DNA süstimine on meetod, kus nukleiinhape sadestatakse erinevate raskemetallide nanoosakestele (sobivad kuld, wolfram, hõbe), mis seejärel kudedesse „pommitatakse”. Osakeste kiirendamiseks kasutatakse rõhu all olevat gaasi. Selliselt kiirendatud osakesed on võimelised tungima koesse mõne millimeetri sügavusele, seejuures transfekterides ainult kindlat kude. Vigastuste määr ja sisenemissügavus sõltub kasutatud partiklite hulgast, suurusest ja kiirusest. Geenipüssi eelisteks on lihtsus ja suhteline ohutus, puuduseks aga suhteliselt madal transfektsiooni efektiivsus (Wang *et al.*, 2013). **Elektroporatsioon** on meetod, kus rakkude plasmamembraanid muudetakse nukleiinhapetele läbitavaks kõrgepingevoolu abil.

Kõrgepingevool indutseerib rakumembraanis ajutisi poore, mida ka suure molekulmassiga (nukleiinhapete korral rohkem kui 100 000 aluspaari pikad) ja negatiivse laenguga molekulid on suutelised läbima. Sealjuures on võimalik transfekterida just huvipakkuvat kude, kuna rakkude elektroporatsioon on ruumiliselt piiratud. Meetodi puuduseks võib pidada võimalikku kahjustavat elektrivoolu mõju organismile ja lühikest maksimaalset elektroodide vahelist kaugust (1 cm), mis piirab korraga transfekteritavate rakkude hulka. Juhul, kui elektroporatsiooni meetodit soovitatakse rakendada siseelunditele, on elektroodide kinnitamiseks vajalik kirurgiline sekkumine (Wang *et al.*, 2013).

Enamik **keemilisi transfektsioonimeetodeid** põhinevad katioonsetel molekulidel, millest tuntumad on katioonsed lipiidid ning katioonsed polümeerid. Tänu nende molekulide

positiivsele laengule on nad võimelised pakkima negatiivse laenguga nukleiinhappe molekulid läbi elektrostaatiliste interaktsioonide. **Katioonsed lipiidid** moodustavad nukleiinhappega nn lipoplekse, kus negatiivse laenguga nukleiinhappe molekulid on pakitud lipiididest koosneva liposoomi-laadse struktuuri sisemusse. Lipopleksid võimaldavad endasse mahutada erineva suuruse ja omadusega bioaktiivseid molekulid ning neid efektiivselt transportida rakkudesse või kudedesse, seejuures kutsumata esile immuunsüsteemi aktivatsiooni. Vaatamata sellele ei ole seni suudetud saavutada kudede ühtlast ja pikaajalist transfektsiooni, kuna liposoomid on kergesti ära tuntavad retikuloendoteliaal-süsteemi poolt, mis need organismist eemaldab ja lagundamisele suunab. Üheks võimalikuks lahenduseks oleks liposoomide pind modifitseerida polüetüleenglükooli (PEG) molekuliga, mis kaitseb neid lagundamise eest, pikendab nende eluiga ja suurendab tõenäosust jõuda sihtmärgini (Milla *et al.*, 2012). Lisaks katioonsetele lipiididele võib lipoplekside moodustamisel kasutada lisandina ka neutraalseid lipiide, näiteks DOPE (dioleüülfosfatidüületanolamiin) või kolesterool, mis vähendavad lipopleksi toksilisust ning suurendavad mõningatel juhtudel transfektsiooni efektiivsust (Wang *et al.*, 2013). **Katioonsed polümeerid** on sarnaselt lipiididel põhineva meetodiga võimelised nukleiinhappe molekulid pakkima väikestesse partiklitesse. Tuntumateks näideteks on polü-L-lüsiin (PLL), polüarginiin, histoonid ning polüetüleenimiin (PEI). Katioonsetele polümeeridele on iseloomulik suur hulk amiinrühmi, mis on neutraalse pH korral vaid osaliselt protoneeritud. Sattudes happelisesse keskkonda nagu endosomaalsed vesiikulid, toimub nende protoneerumine, mille tagajärjel vesiikulid paisuvad, nende membraanid lõhkevad ning vesiikuli sisu paisatakse raku tsütosoliplasmasse (Wang *et al.*, 2013). Katioonsed polümeerid võimaldavad pakkida suurema kui mikromeetrise diameetriga pDNA molekulid nanopartikliteks, suurusega 30 – 100 nm. Suhteliselt väiksemate siRNA molekulide puhul võivad partiklite suurused oluliselt varieeruda, sõltuvalt agregatsiooni määra (Scholz & Wagner, 2012). Pakkimise efektiivsus on oluline, sest nanopartiklite suurus ning suuruse homogeensus võib sageli määrata kompleksi internaliseerimisraja. Lisaks katioonsetele polümeeridele ja lipiididele on kasutusel ka hübriidseid lipiid-polümeer-DNA süsteeme, mis võimaldavad veelgi efektiivsemat pDNA kokkupakkimist (Wang *et al.*, 2013).

1.3 Rakku sisenevad peptiidid.

Vastavalt definitsioonile on rakku sisenevad peptiidid lühikesed, 5 – 40 aminohappe pikkused katioonsed ja / või amfipaatsed järjestused, mis pääsevad raku sisemusse erinevate mehhanismide teel ning millel on ühtlasi võime transportida rakkudesse kovalentselt või

mittekovalentselt konjugeeritud bioaktiivseid lastmolekule (Langel, 2011). RSPd on kõrge potentsiaaliga vektorid, sest võimaldavad transfekterida terveid rakupopulatsioone mittetoksiliselt (Andaloussi *et al.*, 2011).

Positiivsed laengud on olulised RSPde elektrostaatilisel interaktsioonil negatiivselt laetud rakumembraani komponentidega, sealhulgas anioonsete lipiidide ja glükoosamino-glükaanidega. Teiselt poolt on ka hüdrofoobsed interaktsioonid olulised RSPde seondumisel rakumembraaniga ning sisenemisel rakkudesse (Ziegler, 2008).

Esimene kord täheldati valgulise järjestuse võimet rakku siseneda 1988. aastal, kui kaks sõltumatut uurimisgruppi avaldasid tulemused HIV1 viiruse transaktivaatorvalgu TAT kohta (Frankel & Pabo, 1988; Green & Loewenstein, 1988). Mõne aasta pärast ilmusid sarnased tulemused ka *Drosophila* Antennapedia transkriptsioonifaktori kohta, mis oli samuti suuteline läbima rakumembraane ning rakkudesse sisenema (Joliot *et al.*, 1991). TATi ja Antennapedia homeodomääni edasisel uurimisel selgus, et transfektsiooniks on vajalikud ja piisavad vaid lühikesed järjestused: TAT transaktivaatorvalgust eraldatud 13 aminohappeline TAT (48 – 60) ja Antennapedia homeodomääni kolmandast heeliksist eraldatud 16 aminohappeline pAntp (Derossi *et al.*, 1994; Copolovici *et al.*, 2014). Vastavad järjestused said nimeks TAT-peptiid ja Penetratiin ning on olnud aluseks sadade peptiidide otsingule ja sünteesile, mis tänapäeval moodustavad geeniteraapias vektoritena perspektiivikavaldkonna.

Rakku sisenevate peptiidide intensiivse uurimise tulemusel on tänaseks kirjeldatud juba sadu RSP järjestusi. Parema ülevaate saamiseks nende omaduste kohta, on hakatud neid klassidesse jagama. Nii on ühe võimalusena jagatud RSPd päritolu järgi looduslikeks, sünteetilisteks ning kimäärseteks, kus viimased sisaldavad nii looduslikke kui sünteetilisi osi. Selline klassifitseerimine ei anna aga informatsiooni RSPde omaduste kohta. Seetõttu pakkus André Ziegler 2008. aastal välja alternatiivse klassifikatsiooni, mis jagab RSPd klassideks vastavalt interaktsioonidele rakumembraanidega: primaarseteks amfipaatsseteks (paRSP), sekundaarseteks amfipaatsseteks (saRSP) ning mitteamfipaatsseteks (maRSP) järjestusteks (Ziegler 2008). Amfipaatsseteks nimetatakse sellist molekuli, mis koosneb selgesti eristuvatest hüdrofiilsest (katioonsest) ja hüdrofoobsest osast.

paRSPde primaarjärjestus koosneb järjestikku paiknevatest hüdrofoobsest ja katioonsetest domäänist. paRSPd koosnevad reeglina enam kui 20-st aminohappejäägist, sisaldades sealjuures vaid mõnda aluselist AH jääki. paRSPd interakteeruvad ühtmoodi tugevalt nii anioonsete kui neutraalsete rakumembraanidega, mis annab alust arvata, et nende seondumisel

rakumembraaniga on oluline roll hüdrofoobsetel interaktsioonidel (Ziegler, 2008). Primaarsed amfipaatsed RSPd on näiteks Transportaan ja PepFectid.

saRSPd on samuti amfipaatsed, kuid nende amfipaadne struktuur avaldub alles seondumisel raku plasma membraaniga, kui RSP molekulid omandavad alfa-heeliksi või beeta-lehe sekundaarstruktuuri. saRSPd koosnevad üldjuhul vähem kui 20-st aminohappejäägist ning interakteeruvad tugevalt vaid anioonsete membraanidega, kuid mitte neutraalsete membraanidega (Ziegler, 2008). Sekundaarsed amfipaatsed RSPd on näiteks Penetratiin ja CADI.

maRSPd on reeglina lühemad ning koosnevad enamasti ainult katioonsetest aminohapetest. Seetõttu seonduvad maRSPd vaid selliste membraanidega, mis sisaldavad olulisel määral aniooneid lipiide (Ziegler, 2008). Mitteamfipaatsed RSPd on näiteks TAT-peptiid ja nona-arginiin.

Tabel 1. Mõned töös mainitud RSPd klasside kaupa.

Nimi	Aminohappeline järjestus	Allikas
Mitteamfipaatsed RSPd		
TAT-(48-60)	GRKKRRQRRRPPQ-NH ₂	(Vivés <i>et al.</i> , 1997)
Sekundaarsed amfipaatsed RSPd		
Penetratiin-(43-58)	RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂	(Derossi <i>et al.</i> , 1994)
Primaarsed amfipaatsed RSPd		
Transportaan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	(Pooga <i>et al.</i> , 1998)
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	(Soomets <i>et al.</i> , 2000)
PF3	Stearüül-AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	(Mäe <i>et al.</i> , 2009)
PF5	AGYLLG(K*)INLKALAALAKKIL-NH ₂	(Andaloussi <i>et al.</i> , 2011)
PF6	Stearüül-AGYLLG(K*)INLKALAALAKKIL-NH ₂	(Andaloussi <i>et al.</i> , 2011)
PF14	Stearüül-AGYLLGKLLOOLAAALLOOLL-NH ₂	(Ezzat <i>et al.</i> , 2011)

Tärgile (*) vastab rühmitus, mis seob suksüinüleeritud lüsiini külghela kaudu peptiidskeletiga neli trifluorometüülkinooni rühma (Joonis 2)

1.4 RSPde rakku sisenemise mehhanismid

Kuigi RSPsid on uuritud üle veerandsajandi, pole tänaseni RSPde internalisatsiooni mehhanismid üheselt selged. Mitmed uuringud on näidatud, et RSPd võivad rakkudesse sisenemiseks kasutada erinevaid endotsütoosi radasid, sealhulgas klatriin-vahendatud endotsütoosi, kaveoliin-vahendatud endotsütoosi ning makropinotsütoosi (Padari *et al.*, 2005; Säälik *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2005). Huvitav on sealjuures, et

kasutusel võib olla mitu endotsütoosi rada paralleelselt ning erinevate radade kasutamine on sageli ümberlülitatav, sõltudes nii RSP omadustest kui lastmolekuli olemasolust ning eksperimendi tingimustest (Lundin *et al.*, 2008; Duchardt *et al.*, 2007). Lisaks endotsütoosile on näidatud, et mõned RSPd, nagu CADY peptiid, TAT ja R9 võivad rakkudesse siseneda ka energiast sõltumatultotse translokatsiooni teel (Islam *et al.*, 2014; Duchardt *et al.*, 2007; Rydström *et al.*, 2011). RSPde otsese translokatsioonijaoks on pakutud mitmeid mudeleid, millest tuntumad on pööratud mitselli mudel ja pooride moodustamine (Madani *et al.*, 2011). Kõigi pakutud mudelite korral on transfektsiooni esimeseks oluliseks sammuks elektrostaatilised interaktsioonid positiivselt laetud RSP ja negatiivselt laetud raku plasmamembraani komponentide vahel, millele järgneb membraani läbimine ja vabanemine tsütoplasmasse. Tasub märkida, et otsene translokatsioon on tõenäolisem kõrgema RSP kontsentratsiooni ja katioonsete RSPde korral (Madani *et al.*, 2011; Duchardt *et al.*, 2007). Hiljuti, Ezzat *et al.* näitasid, et mõned RSPd võivad rakkudesse sisenemiseks kasutada ka retseptoreid. PepFect14-SCOnanokomplekside sisenemine rakkudesse toimub retseptor-sõltuva endotsütoosi teel klass A koristusretseptorite poolt (Ezzat *et al.*, 2012).

Praeguseks on jõutud üldisele arusaamisele, et RSPde sisenemine toimub siiski peamiselt endotsütoosi teel, eriti kui RSPd on seotud lastmolekuliga. Paraku aga jääb suur osa endotsütoosi teel rakku viidud makromolekulidest (sealhulgas RSP-lastmolekul kompleksid) endotsütootilistesse vesiikulitesse kinni, millele järgneb nende suunamine lagundavatesse lüsoosoomidesse (Madani *et al.*, 2011; Cooper, 2000). Kuna eduka transfektsiooni jaoks on oluline, et terapeutilised molekulid säilitaks funktsionaalsuse ning jõuaksid oma rakusisesse sihtmärgini, tuleb tagada RSP-lastmolekul komplekside võimalikult kiire vabanemine endosoomist tsütoplasmasse. Selleks saab kasutada erinevaid mehhanisme, sealhulgas endosoomi membraani läbistamine pooride abil, partikli fusioon lipiidse kaksikkihiga ning lüsoosoomide hapestamise takistamine „prootonkäsna“ abil, mis lõpeb endosoomi osmootse paisumise ja lõhkemisega (Varkouhi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

1.5 Transportaan ja PepFect-id

1.5.1 Transportaan ja TP10

Transportaan (TP) on kimäärne RSP, mis saadi galparaani modifitseerimise teel (Pooga *et al.*, 1998). Galparaani 27 aminohappeline peptiidskelett koosnes kahest kovalentselt teineteise järele seotud osast: *N-terminuses* paiknevast 13 aminohappejäägi pikkusest neuropeptiidi

galaniin konserveerunud piirkonnast ja *C-terminuses* oleva 14 aminohappejäägi pikkusest herilase peptiidsest toksiinist mastoparaanist. TP saadi, kui Galparaani 13. aminohappejääk proliin asendati lüsiiniga, eesmärgiga uurida Galparaani võimalikku transfektsiooni rakku ning selle rakusisest ja –välist lokalisatsiooni. Transportaanis nähti olulist potentsiaali transfektsioonivektorina, sest lisaks peptiidi heale transfektsioonivõimele võimaldas peptiidi 13. aminohappejääk lüsiin siduda mittekovalentselt ka lastmolekule (Pooga *et al.*, 1998). Selleks, et uurida, millised TP osad on vastutavad transfektsioonivõime eest, sünteesiti TP baasil hulk ühest või teisest otsast lühemaid peptiide. Nii avastati TP10, mille järjestus oli TP N-terminaalsest otsast 10 AH võrra lühem. Teised TP analoogid ei osutunud efektiivseks (Soomets *et al.*, 2000).

1.5.2 PepFect tehnoloogia

PepFectid põhinevad TP10 järjestusel, mida on erinevalt modifitseeritud, et parandada oligonukleotiidide transporti rakkudesse ning kindlustada nende vabanemine endosoomidest. Erinevate funktsionaalrühmadede (rasvhappejäägi ning klorokviini analoogide) lisamise abil ning aminohappelise järjestuse muutmise läbi, on loodud perekond rakku sisenevaid peptiide, mis suudavad efektiivselt rakku viia mitmeid erinevaid lastmolekule. Seni on PepFectidega edukalt transfekteeeritud näiteks siRNAd, SSOd/SCOd ja pDNAd (Lehto *et al.*, 2011; Andaloussi *et al.*, 2011; Veiman *et al.*, 2013). PepFectide transfektsiooniefektiivsus on reeglina kõrge ning tsütotoksilisus madal.

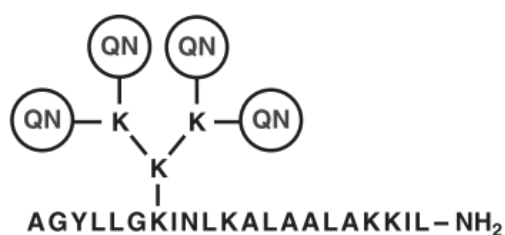
1.5.3 PepFect 3

PepFect 3 oli seerias esimene peptiid ja see saadi N-terminaalse stearüülrühma lisamisega TP10 järjestusele (Mäe *et al.*, 2009) (Joonis 1). Stearüül-rühma lisamine muudab molekuli hüdrofoobsemaks ning parandab amfipaatsete RSPde interaktsioone raku plasmamembraaniga ning hõlbustab RSP liikumist läbi raku plasmamembraani (Mäe *et al.*, 2009). Siiski ei ole rasvhappe lisamine ühtmoodi efektiivne kõikide RSPde jaoks. Samas töös näidati, et katioonsete RSPde R9 ja penetratiini transfektsiooniefektiivsust selline modifikatsioon ei tõstnud (Mäe *et al.*, 2009). Sünteesi järgselt selgus, et PF3 transfekteerib SSOd sama efektiivselt kui kommertsiaalne transfektsioonireagent Lipofectamine 2000. Võrreldes enamiku kasutusel olevate RSPdega, oli transfektsiooniks vajalik SSO kogus ligikaudu 10 korda väiksem, olles efektiivne juba kõigest 200nM oligonukleotiidi kontsentratsiooni juures (Mäe *et al.*, 2009). Ühtlasi on hiljem näidatud, et PF3 nanokompleksid säilitavad efektiivsuse

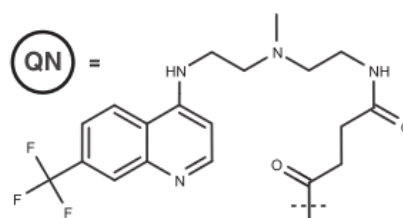
ka vereseerumi valkude juurelolekul ning ei põhjusta tsütotoksilisust ega kutsu esile immunogeenseid nähtusi *in vivo* katsetes hiirtega (Lehto *et al.*, 2011).

1.5.4 PepFect 6

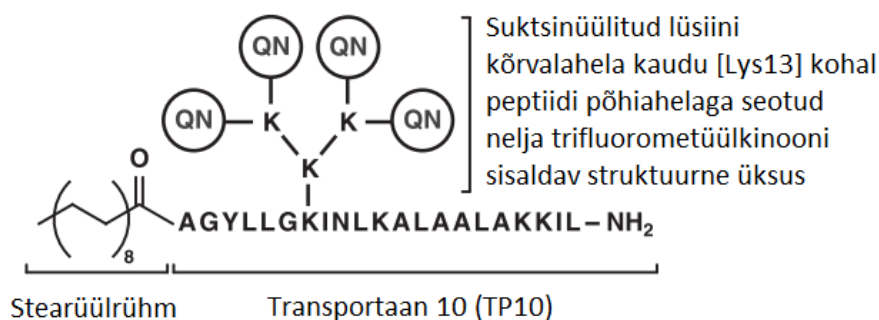
PF3-ga saavutati häid transfektsiooni tulemusi, kuid siiski suur osa nanokompleksidest jäid vesiikulitesse kinni, mistõttu, asuti uurima, kuidas võiks parandada komplekside vabanemist endosoomidest ning jõudmist tsütoplasmasse. Selleks lisati TP10 molekuli seitsmenda aminohappe lüsiin külge kovalentselt ja ortogonaalselt külghel klorokviini analoog trifluorometüülkinooni (QN) nelja funktsionaalrühmaga (joonis 1). Need pH-tiitritavad funktsionaalrühmad pidid parandama RSP võimet vabaneda endosoomidest (Andaloussi *et al.*, 2011; Lehto *et al.*, 2011). QN-rühmadega TP10 modifikatsioon sai nimeks PF5 ning oli väga efektiivne siRNA transfektsioonil, kuid osutus tundlikuks vereseerumi suhtes. Kuna eelnevalt oli näidatud, et stearüülhappejäägi lisamine TP10-le N-terminaalsesse otsavähendas peptiidi tundlikust seerumi valkude suhtes, siis otsustati viia sama modifikatsioon sisse ka PF5 järjestusse. QN-funktsionaalrühmade ja stearüülhappe jäägiga uuele peptiidile anti nimeks PF6 (Andaloussi *et al.*, 2011). PF6-siRNA konstruktid osutusid geenivaigistamisel oluliselt efektiivsemaks kui laialt kasutusel olevad katioonsetel lipiididel põhinevad meetodid Lipofectamine 2000 ja RNAiMAX ning ei näidanud olulist tsütotoksilisust ei *in vitro*ega *in vivo*. (Lehto *et al.*, 2011).



PepFect 5 (PF5)



Suktsinüülitud trifluorometüülkiinoni põhine derivaat



PepFect 6 (PF6)

Joonis 1. PF5, PF6, „QN“ funktsionaalrühm, muudetud joonis (Andaloussi *et al.*, 2011).

1.5.5 PepFect 14

PepFect 14 on järgmine stearüül-TP10 põhjal disainitud peptiid, mille järjestuses olevad lüsiinid ja leutsiinid on asendatud vastavalt ornitiinide ja leutsiinidega (Ezzat *et al.* 2011). Disaini idee põhines varasematel tulemustel, mis näitasid, et polü-L-ornitiin süsteemid on transfektsioonil kuni 10 korda efektiivsemad kui nende vastavad polü-L-lüsiin süsteemid, kuna ornitiinid sidus nukleiinhapet kuni 10 korda tugevamini, mis viis stabiilsemate komplekside moodustumisele madalamate laengute suhte juures (Ramsay and Gumbleton, 2002). Ühtlasi arvatakse, et kuna tegu on mittestandardse aminohappega, on ornitiinid vähem tundlikud seerumiproteaaside suhtes (Lehto *et al.* 2011). PF14 kasutati algselt SSOde transfektsiooniks, hiljem on PF14 abil rakkudesse viidud ka pDNA-d (Veiman *et al.* 2013).

1.6 Polüetüleenglükool ja PEGüleerimine

PEGüleerimine on protsess, kus polüetüleenglükooli molekulahelaid seotakse kovalentselt teise molekuli, näiteks ravimi, terapeutilise valgu või ensüümi külge, sealjuureson PEGüleerimine tavaliselt võimalik PEGi ko-inkubatsioonil modifitseeritavate molekulidega. Selle tulemusel katab PEG osaliselt molekulide pinna ning kaitseb neid protolüütiliste ensüümide, näiteks antikehade või rakkude antigeen-protsesside eest(Veronese, 2001). PEGi sidumisel teiste molekulidega kantakse neile üle ka PEGi füüsikalis-keemilisi omadusi, muutes molekule hüdrofiilsemaks ning suuremaks, mis võimaldab tõsta hüdrofoobsete ravimite ja valkude lahustuvust vees ning orgaanilistes lahustites (Veronese, 2001). Kuna PEGi molekulide kovalentne sidumine võimaldab anda molekulidele mitmeid kasulikke omadusi, nagu muutes nende lahustuvust ja farmakokineetikat, aga ka näiteks valkude ja peptiidide sekundaarstruktuuri, leiab PEGüleerimine meetodina väga laia kasutust(Veronese, 2001).

PEGüleerimise oluliseks puuduseks on aga PEGi molekuli polüdispersus, sest polümeeride sünteesil pole võimalik väga täpselt kontrollida õige pikkusega polümeerahela teket. Kuna PEGi füüsikalis-keemilised omadused sõltuvad polümeerahela pikkusest, suurendab polüdisperse PEGi kasutamine ka modifitseeritavate molekulide polüdispersust. Veelgi enam, sama mehhanism, mis kaitseb PEGiga modifitseeritud molekuli proteolüütiliste ensüümide ning antikehade eest, võib takistada substraadi seondumist valgu aktiivsaidile(Veronese, 2001). Seetõttu kasutatakse näiteks ensüümide PEGüleerimisel erilist hargnenud PEG-vormi, mille korral on täheldatud oluliselt madalamat ensüümi inaktivatsiooni, mida põhjendatakse hargnenud PEGi suurema steerilise takistusega (Veronese, 2001). PEGüleermise puuduseks on ka piirangud sünteesi reaktsioonitsentri valimisel. Kuna vähemaktiivsete nukleofiilide aktiveerimine toob sageli kaasa polüpeptiidahelate siseste ja vaheliste ristsidemete tekke, tuleb sagelikonjugeerida PEG molekuli külge mõne aktiivsema nukleofiili, näiteks alfa- või epsilon-aminorühmaga (Veronese, 2001).

Otsustamaks molekuli PEGüleerimise üle, on oluline kaaluda, kas PEGüleerimisega omandatavad kasulikud omadused, nagu hüdrofiilsus ja kaitse proteolüütiliste ensüümide vastu kaaluvad üle meetodiga seotud võimalikud puudused, nagu polüdispersus, aktiivtsentrite blokeerimine ning probleemid sünteesil.

2 EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgiks on

- iseloomustada pDNA ja PF14 vaheliste nanokomplekside suurust ja morfoloogiat;
- iseloomustada siRNA ja PF6 vaheliste nanokomplekside suurust ja morfoloogiat;
- uurida nanokomplekside võimalikke omaduste muutusi, kui neile lisada juurde PEG-PF14.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud nukleiinhapped ja rakku sisenevad peptiidid

Antud töös kasutati lühikest lutsiferaasi interfereerivatsiRNA-d (5'-GACGAGGACGAGCACUUCUU, 3'-UCCUGCUCUCCUGCUGUGAAG) ja lutsiferaasi kodeerivat plasmiidset DNA-d PGL3 (4,8 kb). Töös kasutatud oligonukleotiidid on saadud prof. Ülo Langeli käest, Stockholmi Ülikoolist. Kasutatavad transportpeptiidid olid PepFect6 (järjestus leitav jooniselt), PepFect14 (Stearüül-AGYLLGKLLOOLAAAALLOLL-NH₂) ja PEGüleeritud-PepFect 14 (PEG molekul on kinnitatud peptiidi külge C-terminaalselt). Kõik antud töös kasutatud RSPd on saadud TÜ Tehnoloogia Instituudist Kaido Kurrikoffi käest.

2.2.2 pDNA-PF14 ja siRNA-PF6 nanokomplekside moodustamine

Peptiid-nukleiinhape kompleksid moodustati mittekovalentse strateegia abil, mis võimaldab PepFecti positiivsete laengute kaudu kondenseerida negatiivselt laetud nukleiinhapet. Kompleksid segati kokku MilliQ vees ning kompleksidel lasti formeeruda 40 min toatemperatuuril. pDNA-PF14 kompleksid moodustati laengute suhtega 1:4 ja siRNA-PF6 kompleksid moodustati molaarsete kontsentratsioonide suhtega 1:40. Lõppkontsentratsioonid olid peptiididel (või peptiidide segul) 24,2 µM, siRNA 0,61 µM ja pDNA 0,01 µg/µL.

Pegüleeritud PF14 (PF14-PEG1000) komplekside moodustamisel kasutati erinevaid PEG-PF14 protsentuaalseid koguseid (10% ja 50%). Näiteks 10% PF14-PEG tähendab, et kogu peptiidi kontsentratsioonist 10% moodustab PEG-PF14. Sellisel juhul komplekseeriti esmalt nukleiinhape PEGüleeritud peptiidiga 5 minuti jooksul ja alles seejärel lisati põhipeptiid.

2.2.3 Transmissioonelektronmikroskoopia

Elektronmikroskoopia jaoks kasutati Formvar võrke, millele oli eelnevalt huumlahendusega sadestatud õhuke (mõnikümmend nm) süsiniku kiht, mis elektritjuhtivuse tõttu kaitseb proovi laengute akumulatsiooni ning seeläbi desintegratsiooni eest. Süsiniku kiht on hüdrofoobne, mistõttu töödeldi võrke täiendavalt huumlahendusega, mis muudab pinna hüdrofiilsemaks ja soodustab lahuste ja lahustes olevate ainete seondumist preparaadile. Süsinikuga katmine ja huumlahendus viidi läbi Chemicumi õppehoones Elektrokeemia laboris magnetron-pihustusmasina abil vastava spetsialisti poolt. Proovid kanti võrkudele ning inkubeeriti 2 min toatemperatuuril. Seejärel pesti võrke 2 korda 3 sekundit MilliQ vees ning negatiivse värvingu saamiseks kontrasteeriti kaks korda 2%-se uranüülatsetaadi lahusega: üks kord 3 sekundit ning teine kord 1 minuti jooksul. Seejärel kuivatati võrgud filterpaberiga nii, et võrkudel säilis õhuke uranüülatsetaadi kiht. Preparaate analüüsiti FEI Tecnai™ G² Spirit transmissioonelektron-mikroskoobiga.

2.2.4 Kvantitatiivne analüüs

Nanokomplekside suuruse uurimiseks mõõdeti 255 PF14-pDNA, 245 PF14(10%PF14-PEG)-pDNA, 379 PF14(50%PF14-PEG)-pDNA, 181 PF6-pDNA, 231 PF6(10%PF14-PEG)-siRNA ja 172 PF6(50%PF14-PEG)-siRNA nanopartikli diameetrid ning arvutati nende keskmised, kokku kolmes katsest. Mõõtmiseks kasutati pilditöötlusprogrammi IrfanView 4. Analüüs teostati MS Excel programmis.

2.3 Tulemused

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli hinnata ja analüüsida erinevate PepFect-ON nanokomplekside suurust ja morfoloogiat ultrastruktuuri tasemel ning hinnata PEGüleeritud-PF14 (PEG-PF14) mõju nende omaduste muutumisele. PepFectide ja nukleiinhapete nanokomplekside suuruse ja morfoloogia uurimiseks valmistati elektronmikroskoopia preparaadid süsinikuga kaetud ja huumlahendusega töödeldud Formvar võrkudele ning kompleksid visualiseeriti negatiivse kontrasteerimise teel uranüülatsetaadi lahusega ning analüüsiti transmissioonelektronmikroskoobiga.

Suuruse ja morfoloogia analüüs koosnes kahest osast, milles esmalt uuriti vastavalt PF14 ja pDNA vaheliste ning PF6 ja siRNA vaheliste nanokomplekside suurust ja morfoloogiat ning

töö teise eesmärgina polüetüleenglükool-1000-ga modifitseeritud PepFect 14 mõju nende omaduste muutumisele.

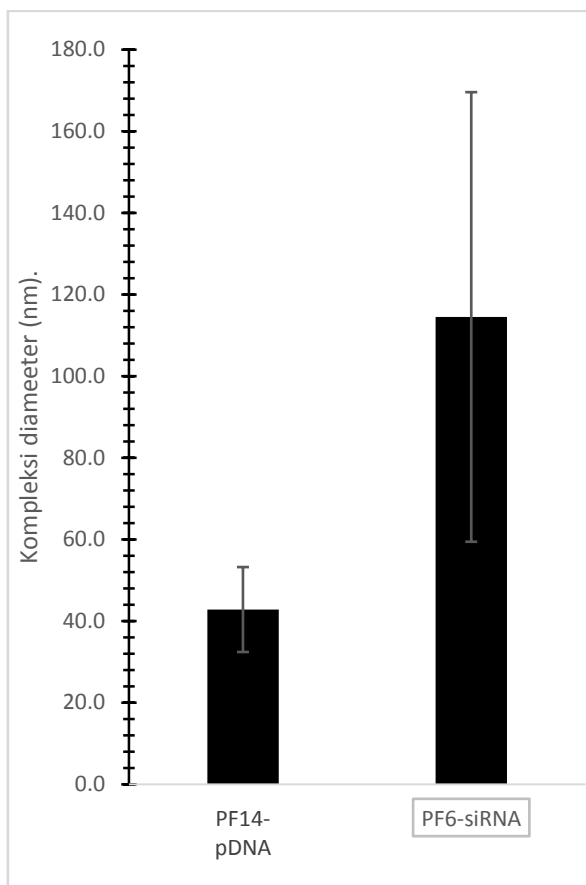
2.3.1 PF14-pDNA nanokomplekside suurus ja morfoloogia

Negatiivne värvimine on lihtne ja kvantitatiivne meetod, et hinnata isoleeritud makromolekulide struktuuri ultrastruktuuritasemel. Negatiivse värvingu tulemusena eristuvad uuritavad nanopartiklid heledamate struktuuridena ülejäänud tumedamast taustast (Joonis 3). Kõik antud töös kasutatud PepFect peptiidid ja nukleiinhapped olid võimelised omavahel nanokomplekse moodustama. PF14 pakib pDNA ebakorrapärase kujuga partikliteks (Joonis 3 A). Enamasti olid tekkinud nanokompleksid pikliku või kergelt väljavenitatud kujuga, vähemal määral leidis sfäärilise morfoloogiaga komplekse. Kompleksid olid teineteisest diskreetselt eraldatud, mis tähendab, et lahuses nad omavahel seondudes suuremaid agregaatide ei moodusta. Seevastu inkubeerides nanokomplekse rakkudega, hakkavad nad omavahel ühinema, mis viib suuremate agregaatide tekkeni (Juks, 2012; Juks, 2010). PF14-pDNA nanokomplekside suuruse hindamiseks mõõdeti 255 kompleksi diameeter ning arvutati nende keskmine diameeter. Tekkinud kompleksid olid suhteliselt ühesuguse suurusega, mille keskmine diameeter oli 43 ± 10 nm (Joonis 2).

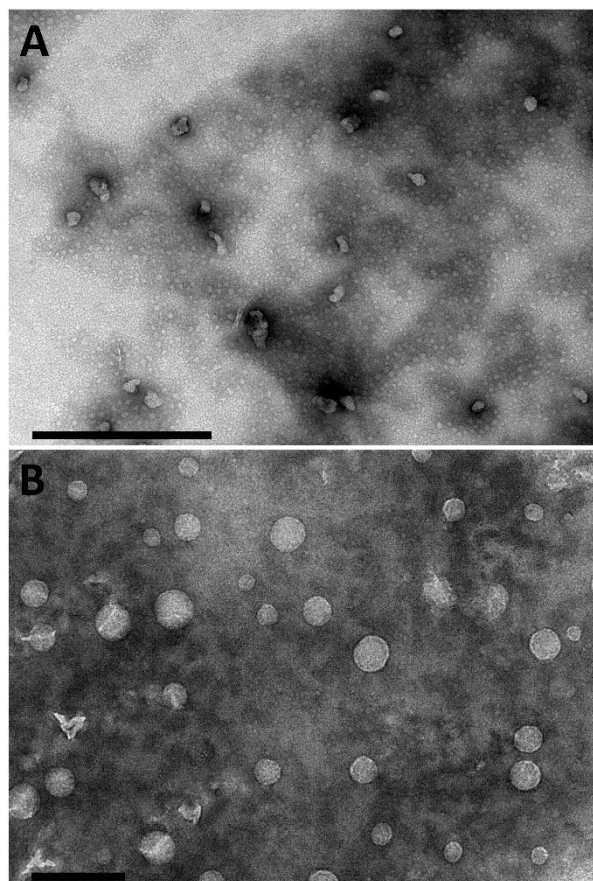
2.3.2 PF6-siRNA nanokomplekside suurus ja morfoloogia

Teiseks uuriti antud töös PF6 ja siRNA vahel moodustunud nanokomplekside morfoloogiat ning suurust. Võrreldes eelpool kirjeldatud PF14-pDNA nanokompleksidega, moodustas PF6 siRNAga morfoloogiliselt väga erinevaid struktuure (joonis 3). PF6 ja siRNA vahel tekkinud kompleksid olid märksa regulaarsema kujuga (joonis 3B): enamik neist olid sfäärilised, mõned kergelt ovaalse kujuga. Saadud tulemused on kooskõlas ka varasemate rakukultuuris tehtud eksperimentidega, kus PF14 moodustas SCO-ga ebakorrapärase kujuga nanokomplekse, seevastu PF6 ja SCO vahel tekkisid regulaarsed ja sfäärilised nanokompleksid (Juks, 2010; Juks, 2012). Kuigi komplekside formeerimiseks on kasutatud erinevaid oligonukleotiide, on PepFectid võimelised neid pakkima üsna sarnase kujuga partikliteks.

Moodustunud komplekside suuruse hindamiseks mõõdeti 181 kompleksi läbimõõdud ning nende keskmiseks diameeteriks oli 115 ± 55 nm (joonis 2). Nii visuaalsel vaatamisel kui ka mõõtmisel selgus, et PF6-siRNA nanokompleksid olid suuruse poolest väga heterogeensed: leidis nii suuremaid (150 - 200 nm) kui ka väiksemaid nanokomplekse (50-100 nm).



Joonis 2. PepFect-nukleiinhape nano-
komplekside suurus.Elektronmikrofotodelt
mõõdeti PF14 ja pDNA ning PF6 ja siRNA vahel
tekkivate nanokomplekside keskmine diameeter.



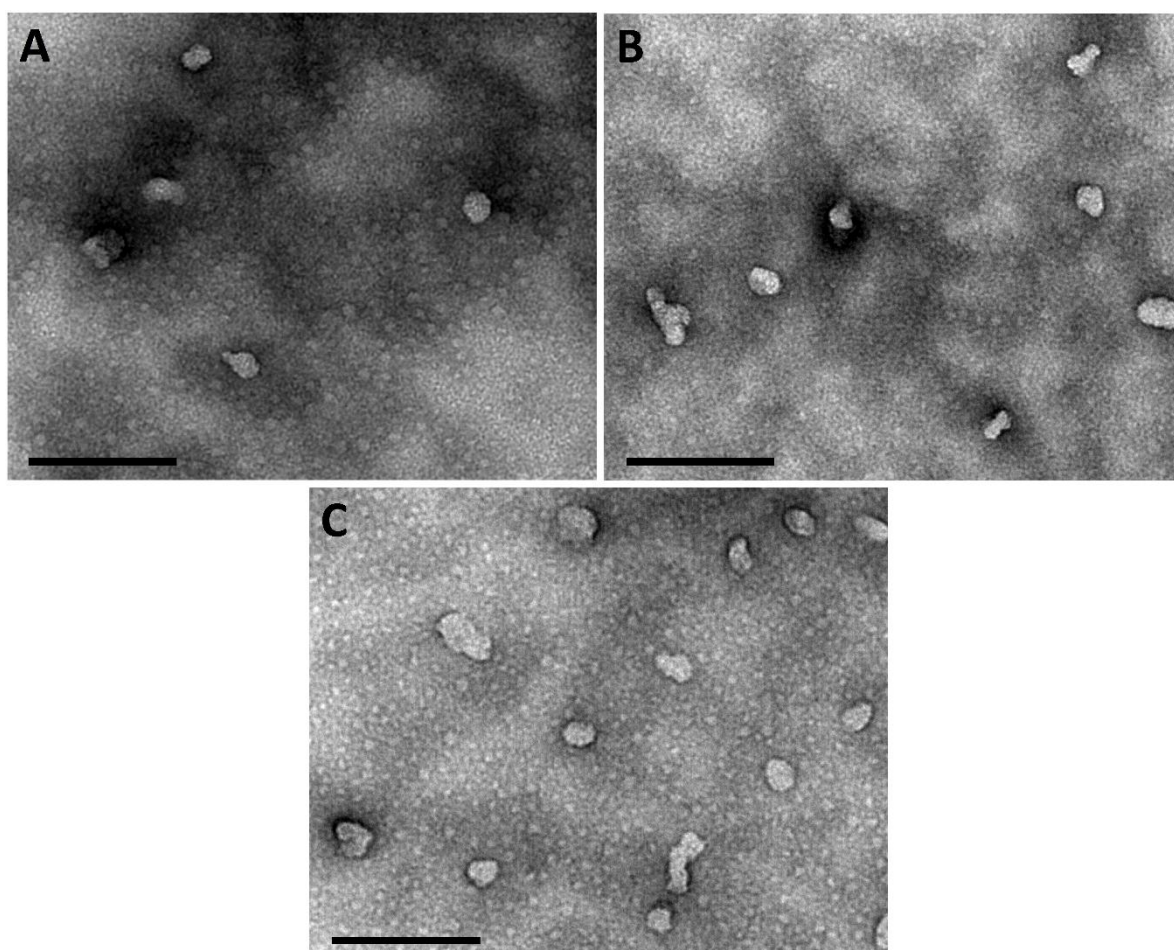
Joonis 3. PepFect-nukleiinhape nanokomp-
leksid elektromikrofotodel.PF14-pDNA (A);
PF6-siRNA (B). Mõõtlõigud 500 nm.

2.3.3 PEGüleeritud-PF14 mõju PF14-pDNA ja PF6-siRNA vaheliste nanokomplekside moodustumisele

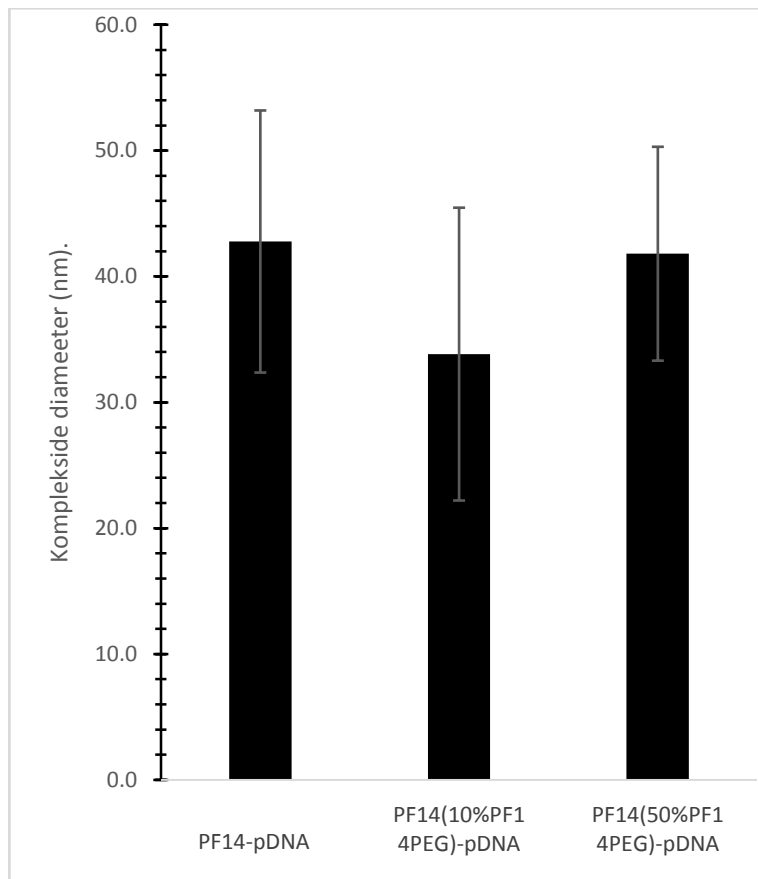
PEG-molekuli lisamine transportvektoritele või nanokompleksidele on üsna levinud meetod, mis pikendab nende eluiga *in vivo* ning kaitseb proteolüütilise lagundamise eest (Milla *et al.*, 2012).PEG1000 molekuli mõju uurimiseks komplekside suurusele ja morfoloogiale vaadeldi PepFect-nukleiinhape preparaate, milles põhipeptiid oli osaliselt asendatudPEGüleeritud peptiidiga PF14-PEG1000 (10% ning 50% ulatuses).

Mõõdetud 245 PF14(10%PF14-PEG)-pDNA kompleksi ning 379 PF14(50%PF14-PEG)-pDNA kompleksi keskmised diameetrid olid vastavalt $34 \pm 12\text{nm}$ ning $42 \pm 9\text{ nm}$ (joonis 5), mis ei erinenud oluliselt PF14-pDNA kompleksidest ($d = 43 \pm 10\text{ nm}$). Kuna aga (100% PEG)-PF14 ja pDNA vahelisi komplekse ei õnnestunud korduval analüüsis TEMis näha, siis

ei saa öelda, kas ja kuidas mõjutaks PEGüleeritud peptiidi täiendav lisamine PF14-pDNA komplekside suurustele. Samuti, pelgalt visuaalse vaatamisega ei saa väga täpselt hinnata PEGüleerimise mõju komplekside morfoloogiale. Võrreldes omavahel PF14-pDNA, PF14(10% PEG-PF14)-pDNA ning PF14(50%PEG-PF14)-pDNA nanokomplekside morfoloogiat, võib siiski näha, et moodustunud kompleksid on kõikidel juhtudel ebaregulaarse ja väljavenitatud kujuga (joonis 4). Järelikult ei avalda erinev PEGi osakaal komplekside kujule uuritud vahemikus olulist mõju (joonis 4 B ja C; joonis 5).



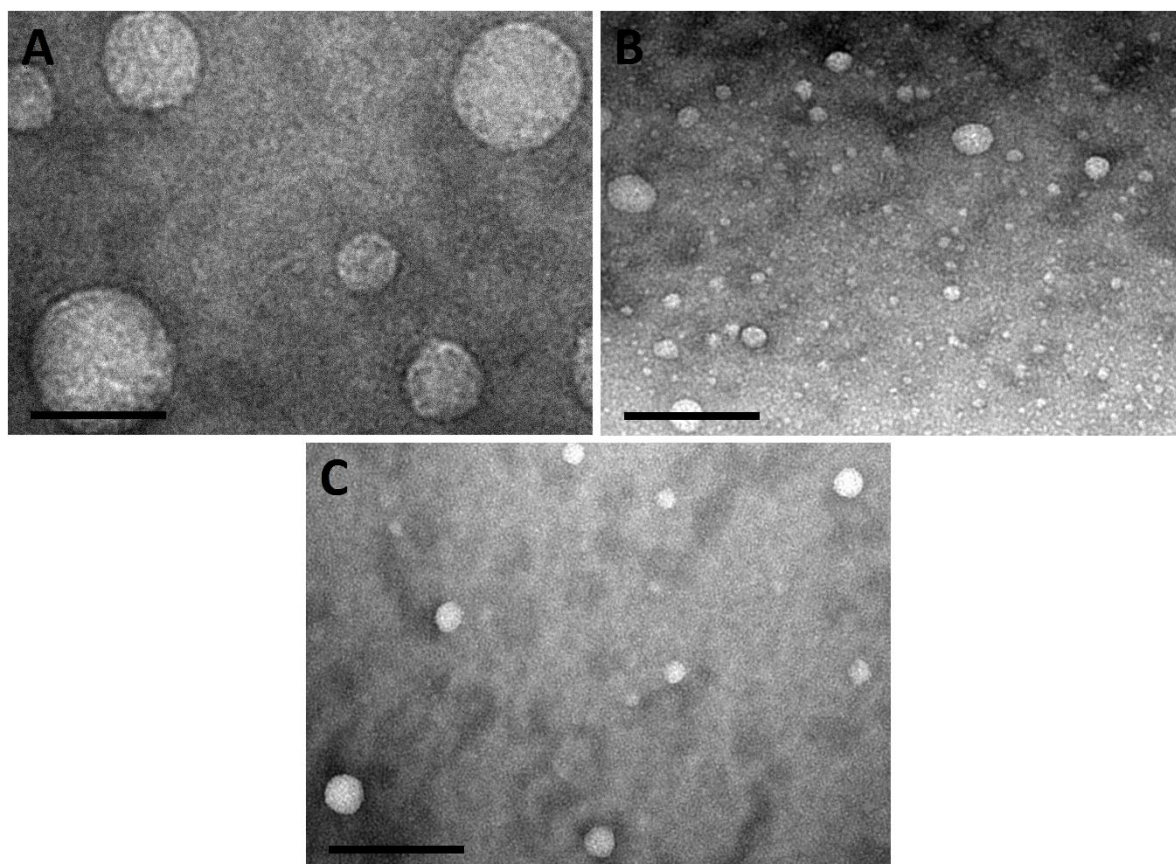
Joonis 4. PEGüleeritud-PF14 mõju PF14 ja pDNA vahelistele nanokompleksidele.PEGüleeritud peptiidi lisamine ei mõjutanud märgatavalt PF14 ja pDNA vaheliste nanokomplekside suurust ega morfoloogiat.PF14-pDNA (A); PF14(10%PF14-PEG)-pDNA (B); PF14(50%PF14-PEG)-pDNA (C). Mõõtlõik 200 nm.



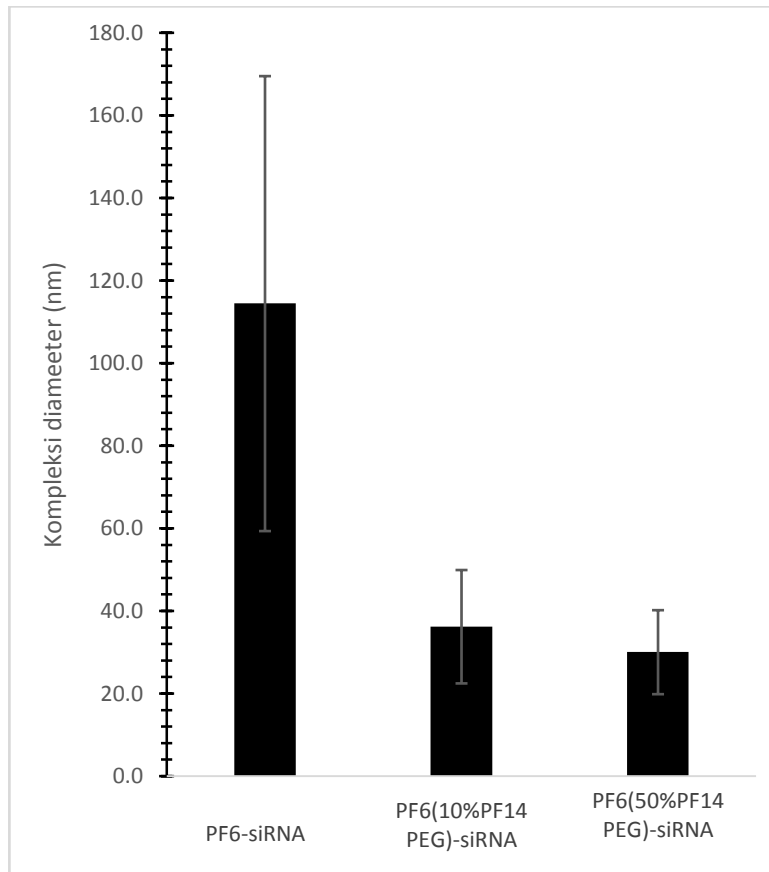
Joonis 5. PEG-PF14 mõju PF14 ja pDNA vaheliste nano-komplekside suurusele. Elektronmikrofotodelt mõõdeti PF14 ja pDNA vahel tekkivate nanokomplekside keskmine diameeter, erineva PEGüleeritud-PF14 sisaldusega proovides.

Teiseks analüüsiti PEGüleeritud-PF14 mõju PF6-siRNA nanokomplekside moodustumisele. Ühendades kahe efektiivse transportvektori omadused, võib tulemuseks olla efektiivsem transfektsioon just *in vivo* süsteemides. Ühelt poolt peaks oligonukleotiidide seondumine PepFect14-ga viima stabiilsemate komplekside tekkele ning PEG modifikatsioon pikendama nende ringlust organismis *in vivo*, teisalt aga peaks PepFect6 endosomolüütilise toimega klorokviinilaadne modifikatsioon hõlbustama komplekside vabanemist endosoomidest. Kuna on teada, et PF14 ja PF6 moodustavad nii suuruselt kui kujult väga erinevaid nanokomplekse, oli käesolevas töö eesmärgiks välja uurida, millise PepFecti omadusega võivad olla tekkinud kompleksid. Selgus, et PEGüleeritud-PF14 lisamine PF6-nanokompleksidele viis väiksemate nanokomplekside moodustumisele, mis aga säilitasid PF6 nanokompleksidele iseloomuliku sfäärilise kuju (joonis 6 C ja D). Visuaalsel vaatamisel selgus, et PEG-PF14 osakaalu tõustes komplekside kuju ei muutunud, ühtlased sfäärilised kompleksid olid iseloomulikud nii 10% kui 50%-se PEG-PF14 sisaldusega PF6-siRNA kompleksidele (joonis 6 C ja D). Moodustunud partiklite suuruse hindamiseks mõõdeti kolme katse põhjal 231 partiklit, mis sisaldasid 10% PEGüleeritud-PF14 ning 172 partiklit, mis

sisaldasid 50% PEG-PF14. Komplekside keskmisteks diameetriteks saadi vastavalt 36 ± 14 nm ning 30 ± 10 nm (joonis 7). PF6(PEG-PF14)-siRNA komplekside suurused erinevad oluliselt eelnevalt mõõdetud PF6-siRNA nanokomplekside keskmisest diameetrist (115 ± 55 nm), olles enam kui kolm korda väiksemad. Lisaks viis PEG-PF14 lisamine märksa ühtlasema suurusega partiklite tekkele. Saadud tulemustest võib järeldada, et PF6(PEG-PF14)-siRNA kompleksidel on mõlema RSP tunnuseid: PF14 lisamine viib komplekside suuruse vähenemisele, säilitades samas PF6 iseloomuliku sfäärilise kuju. Kuna kasutati PEGüleeritud peptiidi, ei ole selge, kuivõrd on nanokomplekside suuruse muutumise taga PF14-ga kovalentselt seotud PEGi molekul.



Joonis 6. PEGüleeritud-PF14 mõju PF6 ja siRNA vahelistele nanokompleksidele. PEGüleeritud peptiidi lisamine viis väiksemate komplekside tekkele, samas kui morfoloogia ei muutunud. PF6-siRNA (A); PF6(10%PF14-PEG)-siRNA (B); PF6(50%PF14-PEG)-siRNA (C). Mõõtlõik 200 nm.



Joonis 7. PEGüleeritud-PF14 mõju PF6 ja siRNA vaheliste nanokompleksidesuurusele. Elektronmikrofotodelt mõõdeti PF6 ja siRNA vahel tekkivate nanokomplekside keskmine diameeter, erineva PEGüleeritud-PF14 sisaldusega proovides.

2.4 Arutelu

Kuigi rakku sisenevad peptiidid on viimase kahekümne aasta jooksul intensiivselt uuritud valdkond, pole tänaseni täpselt selge, kuidas RSPd rakkudesse sisenevad. RSPde rakkusisenemine on kompleksne protsess, kus võimalik on nii endotsütoos kui otsene translokatsioon läbi rakumembraani, sealjuures võib paralleelselt olla kasutusel mitu internalisatsiooni rada (Lundin *et al.*, 2008; Padari *et al.*, 2005). RSPde sidumine lastmolekulidega mõjutab täiendavalt internaliseerumise mehhanisme ning erinevate radade kasutamine on sageli ümberlülitatav, sõltuvalt nii RSP kui lastmolekuli omadustest kui ka eksperimendi tingimustest (Geng *et al.*, 2007; Gratton *et al.*, 2008). Bioaktiivsete nanopartiklite jõudmine sihtmärgini ning nende toime avaldumine on tugevalt seotud ka moodustuvate partiklite omadustega nagu suurus, kuju ja laeng. *In vivo* nukleiiinhapetel põhinevate transportsüsteemide kasutamist piiravad mitmed asjaolud, nagu organismi bioloogiliste barjääride ületamine (raku plasmembraanid) ning kiire elimineerimine organismi kaitsesüsteemide poolt. Bioaktiivsete ainete süsteemseks manustamiseks *in vivo* peetakse optimaalseks nanopartiklite suurust kuni 200 nm, kuna arvatakse, et sellise suurusega molekulid endotsüteeritakse kõige efektiivsemalt ning neid ei elimineerita nii kiiresti organismi kaitsesüsteemide poolt (Moghimi *et al.* 2001; Yoo *et al.*, 2011). Teisalt võib ka nanopartiklite kuju olulisel määral mõjutada nende omastamist keskkonnast ning rakkudesse sisenemist (Yoo *et al.*, 2011). Varasemalt on näidatud, et sfäärilise kujuga nanopartiklid sisenevad peamiselt klatriin-sõltuva endotsütoosi teel, seevastu suuremamõõtmelised, pikliku ja väljavenitatud kujuga nanopartiklid kasutavad rakkudesse sisenemiseks peamiselt makropinotsütoosi (Herd *et al.*, 2013). Enamik tänapäeval kasutusel olevatest transportvektoritest moodustavad sfäärilise struktuuriga nanopartikleid, kuna sellist morfoloogiat peetakse kõige stabiilsemaks ning neid omastatakse ka kõige efektiivsemalt. Samas ei ole võimalik alati pelgalt kuju järgi hinnata nanopartiklite funktsionaalsust. Mitmed varasemad tööd on tõestanud ka vastupidiseid tulemusi, kus pikliku kujuga partiklid on osutunud märksa efektiivsemateks transportvektoriteks kui nende sfäärilised analoogid (Champion *et al.*, 2006; Geng *et al.*, 2007; Andaloussi *et al.*, 2011).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli iseloomustada pDNA ja PF14 vaheliste ning siRNA ja PF6 vaheliste nanokomplekside suurust ja morfoloogiat ultrastruktuuri tasemel. Teiseks eesmärgiks oli hinnata PEG molekuli mõju nende nanokomplekside samade omaduste muutumisele. RSPde nukleiiinhapetega moodustuvate nanokomplekside suuruse ja

morfoloogia uurimine on oluline RSPde transfektsioonimehhanismide paremaks mõistmiseks ning uute RSPde sünteesiks. Siiani on RSPde ja nende nukleiinhappe komplekside suurusi mõõdetud peamiselt dünaamilise valguse hajumise meetodiga (DLS- *dynamic light scattering*). DLS võimaldab analüüsida küll lahuses olevate partiklite suurusi ja hinnata nende homogeensust, kuid siiski ei anna informatsiooni partiklite morfoloogia kohta. Selleks, et paremini mõista, milliste faktorite mõjul nende sisenemine rakkudesse toimub, on siinkohal olulised ka nanopartiklite morfoloogilised uuringud.

Antud töös uuriti kahe PepFect perekonna peptiidi, PF6 ja PF14 nanokomplekside omadusi. PF6 on stearyül-TP10 analoog, mis sisaldab oma struktuuris täiendavat lisamodifikatsiooni klorokviinilaadse molekuli näol, mis on võimeline takistama endosoomide hapustumist prootonite sidumise abil („prootonkäs“) ning vabastama endosoomidesse kinni jäänud molekulid endosoomide osmootse lõhkipaisumise teel (Andaloussi *et al.*, 2011). Ka PF14 on TP10 baasil disainitud RSP, mille peptiidskeletis on lüsiinide asemel positiivse laengu allikaks mittestandardne aminohape oriniin, mis varasemalt on parandanud oluliselt komplekside stabiilsust ka vereseerumivalkude juuresolekul (Ezzat *et al.*, 2011). Lisaks peptiidskeleti modifitseerimisele, lisati ka PF14-le N-terminaalselt stearyülhappejääk, soodustamaks hüdrofoobseid interaktsioone membraanidega (Lehto *et al.*, 2011).

Meie labori poolt varem tehtud katsed on tõestanud, et mõlemad PepFect peptiidid on võimelised moodustama nukleiinhapetega nanokomplekse, mis efektiivselt endotsüteeritakse rakkudesse (Juks 2010, 2012). Kuigi samades töödes selgus, et PF6 ja PF14 moodustavad erineva kujuga partiklid, olid need katsed siiski tehtud rakukultuuris, mistõttu interaktsioonid rakkudega võivad täiendavalt mõjutada nanopartiklite omadusi. Lisaks TEM analüüsiks rakukultuuris on vajalik rakkude fikseerimine, mis võib täiendavalt mõjutada nanokomplekside kuju ja suurust. Seetõttu oleks vaja uurida nende morfoloogiat eraldatud süsteemis.

TEM tulemustest selgus, PepFect 14 ja Pepfect 6 moodustavad nukleiinhapetega väga erineva suuruse ja kujuga partikleid. PepFect 14 pakib pDNA ebakorrapärase kujuga, kergelt väljavenitatud ja piklikeks partikliteks, mis ei moodusta omavahel suuremaid agregate. Suuruselt olid PF14-pDNA partiklid üsna ühesugused, mille keskmine diameeter oli 43 nm. Hiljuti on Veiman ja kaasautorid DLS analüüsiga mõõtnud PF14-pDNA partikleid ning saanud oluliselt suurema hüdrodünaamilise diameetriga partikleid, mille suurused sõltuvalt laengusuhetest olid 130 – 170 nm vahel (Veiman *et al.*, 2013). DLSga mõõtes tuleb lisaks arvestada ka lahuse molekulidega, mis ümbritsevad nanopartikleid, mistõttu saadaksegi DLSga mõõtes suurema läbimõõduga nanopartiklid kui seda oli näha TEMis. Tekkinud PF14-

pDNA partiklid paiknesid üksteisest eraldi, mis näitab, et vesilahuses nad omavahel ühinedes suuremaid agregaatide ei moodusta. Nanokomplekside agregeerumine ning koondumine suurematesse hargnevatesse struktuuridesse leiab aset nende inkubeerimisel rakkudega (Ezzat *et al.*, 2012, Padari *et al.*, 2010), mis võib olla põhjustatud nanokomplekside seondumisega rakupinna negatiivselt laetud glükoosaminoglükaanidega või interaktsioonidel seerumvalkudega.

PepFect 6 ja siRNA vahel moodustunud nanokomplekside morfoloogia ja suuruse uurimisel selgus, et võrreldes PF14-pDNA nanokompleksidega moodustab PF6 siRNAga morfoloogiliselt väga erinevaid struktuure. Tekkinud kompleksid olid korrapärase ja sfäärilise kujuga. Erinevalt PF14-pDNA kompleksidest, moodustas PF6 märksa suuremaid partikleid (115 nm). Nii visuaalsel vaatamisel kui ka mõõtmisel selgus, et PF6 moodustas siRNAga suuruse poolest väga heterogeenseid nanokomplekse, mille hulgas leidis nii suuremaid (150 - 200 nm) kui ka väiksemaid komplekse (50-100 nm). Sarnaseid tulemusi on hiljuti saadud ka DLS analüüsiga, kus selgus, et PF6-siRNA partiklite suurus sõltub oluliselt peptiid-siRNA molaarsest suhtest (Kent Langel, avaldamata andmed). Madalamatel molaarsetel suhetel tekivad suuremad partiklid (300-500 nm), kõrgematel peptiid/siRNA molaarsuhetel (suurem kui 20) moodustusid väiksemad, umbes 100 nm suurused partiklid. Käesolevas töös moodustati siRNA-PF6 kompleksid molaarsuhtel 1:40, mistõttu on käesolevas katses mõõdetud tulemused hästi kooskõlas varem saadud tulemustega. Samuti on meie laboris varasemalt saadud analoogseid tulemusi PF6-SCO komplekside inkubeerimisel rakkudega, mis moodustasid sfäärilise kujuga ning erineva suurused partikleid (Juks, 2010). Kuigi rakukultuuri katsetes ja käesolevas töös on kasutatud komplekside formeerimiseks erinevaid oligonukleotiide, võivad PepFectid pakkida need sarnase kujuga partikliteks. Sellest võib järeldada, et komplekside suuruse ja kuju määravad olulisel määral just RSP omadused, sõltumata kasutatava lastmolekuli omadustest. Sfääriliste komplekside tekkimine võib olla seotud PF6 järjestuses oleva klorokviinilaadse molekuliga, mis võib ühtlasi viia ka suuremate komplekside tekkeni, võrreldes PF14-ga, mille järjestuses selline modifikatsioon puudub.

Töö teiseks eesmärgiks oli hinnata PEGüleeritud PF14 molekuli mõju nanokomplekside suuruse ja kuju muutumisele. PEG-molekuli lisamine transportvektoritele või nanokompleksidele on üsna levinud meetod, mis pikendab bioaktiivsete molekulide eluiga *in vivo* ning kaitseb neid proteolüütilise lagundamise eest (Yoo *et al.*, 2011). TEM tulemustest selgus, et PEGüleeritud PF14 lisamisel oli PF14-pDNA ning PF6-siRNA nanokompleksidele erinev mõju. PF14-pDNA kompleksid säilitasid nii suuruse kui morfoloogia ning seda sõltumata PEGüleeritud peptiidi osakaalust. Samas PEG-PF14 lisamine PF6-siRNA

kompleksidele mõjutas oluliselt tekkivate struktuuride suurust. Seejuures nanokomplekside morfoloogia ei muutunud ka PEG-PF14 osakaalu tõstmisel 10-lt protsendilt 50-le: mõlemal juhul tekkisid ühtlase suuruse ja sfäärilise kujuga kompleksid. Mõõtmise tulemusena selgus, et PF6-siRNA ja PF14-PEG moodustavad peptiid:peptiid molaarsuhtes 9:1 ja 1:1 komplekse suurusega vastavalt 36 ± 14 nm ning 30 ± 10 nm. Võrreldes PF6-siRNA nanokompleksidega ($d = 115 \pm 55$ nm), on tegemist enam kui 3 korda väiksemate ja palju ühtlasema suurusega partiklitega. Saadud tulemused on vasturääkivad üldisele teadmisele, mille kohaselt PEG molekuli lisamine peaks vastupidiselt käesolevale töö tulemustele hoopis suurendama bioaktiivsete partiklite suurust ja molekulmassi (Milla *et al.*, 2012). Komplekside suuruse vähenemine võib olla tingitud mitmetest asjaoludest. PEG molekul on kovalentselt seotud PF14 külge, mistõttu PEG ei saa toimida vabalt, vaid seotuna PF14 küljes. Teisalt võib see olla põhjustatud PEG-PF14 ja siRNA vahel moodustatud eelkompleksidest, pärast mida lisati alles PF6. Võib arvata, et PF14 pakib siRNA eelnevalt tihedamalt kokku ning PF6 omab edasisel pakkimisel väiksemat rolli. Samas ei õnnestunud korduvate katsetega visualiseerida täielikult pegüleeritud-PF14 ja siRNA komplekse, mistõttu põhjanevate järelduste tegemiseks oleks vajalikud mitmed lisakatsed. Siiski tulemustest võis järeldada, et PEG-PF14-PF6-siRNA kompleksidel on mõlema RSP tunnuseid: PF14 lisamine viis väiksemate komplekside tekkeni, misaga säilitavad PF6-le iseloomuliku sfäärilise kuju.

KOKKUVÕTE

RSPde nukleiinhapete nanokomplekside sisenemine rakkudesse on keeruline protsess, kus on võimalik nii otsene translokatsioon läbi rakumembraani kui erinevate endotsütoosi radade kasutamine. Selleks, et paremini mõista RSPde vahendatud transfektsiooni mehhanisme ning luua efektiivsemaid vektoreid, on oluline uurida RSPde ja nukleiinhapete vahel moodustuvate nanokomplekside omadusi, mis võib täiendavalt mõjutavada nende omastamist keskkonnast.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida PepFecti perekonna RSPde PF6 ja PF14 nukleiinhapete nanokomplekside suurust ja morfoloogiat ning PEGüleeritud RSP (PEG-PF14) lisamise mõju komplekside samadele omadustele.

Transmissioonelektronmikroskoopia tulemustest selgus, et PepFect 14 ja Pepfect 6 moodustavad nukleiinhapetega väga erineva suuruse ja kujuga partikleid. PepFect 14 pakib pDNA ebakorrapärase, väljavenitatud kujuga partikliteks. PF14-pDNA partiklid olid märksa homogeensema suurusega ning nende keskmine diameeter oli 43 nm. Erinevalt PF14-pDNA kompleksidest moodustab PepFect 6 siRNAga korrapärase ja sfäärilise kujuga partikleid. Seevastu PF6-siRNA partiklid olid väga heterogeense suurusega ja nende keskmine diameeter oli 115 nm.

Veel selgus, et PEGüleeritud-PF14 mõju nanokomplekside suurusele ja kujule on erinev: PF14-pDNA kompleksid säilitasid nii ligilähedase suuruse kui morfoloogia, sõltumata PEGüleeritud peptiidi osakaalust, samas kui PEGüleeritud-PF14 lisamine PF6-siRNA kompleksidele vähendas oluliselt tekkivate struktuuride suurust. Huvitaval kombel ei muutnud täiendavalt komplekside suurust PEG-PF14 osakaalu suurendamine 10-l protsendilt 50-le. Kuna PEG-PF14 lisamine ei muutnud PF6-siRNA nanokomplekside kuju, võib järeldada, et PEG-PF14-PF6-siRNA kompleksidel on mõlema RSP tunnuseid. Sellised kolmikkompleksid, milles on ühendatud kahe transportvektori omadused- pikem eluiga *in vivo* ning efektiivne vabanemine endosoomidest- võivad olla transfektsioonil efektiivsemad ning tagada oligonukleotiidide parema funktsionaalsuse.

SUMMARY

In order to fully benefit from modern gene therapy methods, such as gene silencing and splice correction, so as to be able to cure and treat various diseases of different nature, it is vitally important to find ways to secure their effective cellular delivery. Due to the fact that nucleic acids are unable to enter cells on their own, their transfection needs to be mediated by transport vectors. Cell penetrating peptides are novel transport vectors that mediate efficient and safe nucleic acid transfection by packing nucleic acids into nanocomplexes. In order to develop more efficient CPPs, it is necessary to understand how the size and morphology of complexes are dependent on the CPP structure.

The aim of the present study was to characterize the size and morphology of the complexes formed by PepFects upon interaction with nucleic acids, as well as to evaluate the effect of added PEGylated-PF14 on the properties of these nanocomplexes. PEGylation is a commonly used method to prolong the lifetime of bioactive molecules *in vivo* and to protect them from proteolytic disintegration.

Transmission electron microscopy analysis revealed that PepFect 14 and PepFect 6 form particles with different size and morphology. PF14 with pDNA produces elongated complexes with homogenous size around 43 nm, while PF6 with siRNA produces considerably more regular and spherical complexes. Formed complexes were much larger and heterogenous in their size, having diameter about 115 nm.

The added PEGylated-PF14 differently affected the size and morphology of PF14-pDNA and PF6-siRNA nanocomplexes. As far as it could be determined, PF14-pDNA complexes remained virtually unaltered. However, after addition of PEG-PF14, the size of PF6-siRNA nanoparticles significantly reduced. Interestingly, the increase of PEG-PF14 from 10% to 50% of total peptide content did not induce further changes in the particles' properties. The size of the particles corresponding to 10 and 50% PEG-PF14 content were around 36 nm and 30 nm in diameter, which is over 3-fold lower than was typical for PF6-siRNA complexes ($d = 115 \pm 55$ nm). All things considered, our results about the morphology of PepFects and nucleic acid complexes could provide an essential insight for developing new CPP based transfection reagents or improve existing systems.

KIRJANDUSE LOETELU

- Andaloussi, S. El, Lehto, T., Mäger, I., Rosenthal-Aizman, K., Oprea, I. I., Simonson, O. E., Sork, H., Ezzat, K., Copolovici, D. M., Kurrikoff, K., Viola, J. R., Zaghloul, E. M., Sillard, R., Johansson, H. J., Said Hassane, F., Guterstam, P., Suhorutšenko, J., Moreno, P. M. D., Oskolkov, N., Hälldin, J., Tedebark, U., Metspalu, A., Lebleu, B., Lehtiö, J., Smith, C. I. E., Langel, Ü. (2011). Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic. Acids. Res.* 39: 3972-3987.
- Bennett, C. F., Swayze, E. E. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50: 259-293.
- Geng, Y., Dalhaimer, P., Cai, S., Tsai, R., Tewari, M., Minko, T., Discher, D. E. (2007). Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nature Nanotechnology* 2: 249-255.
- Champion, J. A., Mitragotri, S. (2006). Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 4930-4934.
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. ASM Press.
- Copolovici D. M., Langel, K., Eriste E., Langel Ü. (2014). Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS nano* 8(3): pp.1972–1994.
- Dean, N.M. & Bennett, C.F. (2003). Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 22(56): 9087–9096.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1994). The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological membranes. *J. Biol. Chem.* 10444–10450.
- Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., Brock, R. (2007). A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides. *Traffic* 8: 848-866.
- Ezzat, K., Andaloussi, S. El, Zaghloul, E. M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P. M. D., Viola, J. R., Magdy, T., Abdo, R., Guterstam, P., Sillard, R., Hammond, S. M., Wood, M. J. A., Arzumanov, A. A., Gait, M. J., Smith, C. I. E., Hällbrink, M., Langel, Ü. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res.* 39(12): 5284–5298.
- Ezzat, K., Helmfors, H., Tudoran, O., Juks, C., Lindberg, S., Padari, K., Andaloussi, S. El, Pooga, M., Langel, Ü. (2012). Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *FASEB J.* 26: 1172-1180.
- Frankel, A. D., Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55(6): 1189-1193.
- Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *PNAS* 105: 11613-11618.

- Green, M., Loewenstein, P. M.(1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55(6): 1179-1188.
- Herd, H., Daum, N., Jones, A. T., Huwer, H., Ghandehari, H., Lehr, C. M.(2013). Nanoparticle geometry and surface orientation influence mode of cellular uptake. *ACS Nano* 7: 1961-1973.
- Islam, M. Z., Ariyama, H., Alam, J. M., Yamazaki M.(2014). Entry of cell-penetrating Peptide transportan 10 into a single vesicle by translocating across lipid membrane and its induced pores. *Biochem. Cell Biol.* 53(2): 386–396.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A.(1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *PNAS* 88(5): 1864–1868.
- Juoks, C., 2010. Oligonukleotiidide transport teise põlvkonna rakku sisenevate peptiidide abil.
- Juoks, C., 2012. Peptiidsete transporterite kasutamine oligonukleotiidide suunamiseks rakkudesse.
- Kole, R., Krainer, A.R. & Altman, S.(2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11(2): 125–140
- Kurreck, J.(2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* 270(8): 1628–1644.
- Langel, Ü.(2011). *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*. Humana Press, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- Lehto, T., Ezzat, K. & Langel, Ü.(2011). Peptide nanoparticles for oligonucleotide delivery. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 104: 397–426.
- Lundin, P., Johansson, H., Guterstam, P., Holm, T., Hansen, M., Langel, Ü., Andaloussi, S. El(2008). Distinct Uptake Routes of Cell-Penetrating Peptide Conjugates. *Bioconjug. Chem.* 19: 2535-2542.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S., Gräslund, A.(2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J.Biophys.* 414729.
- Milla, P., Dosio, F., Cattel, L.(2012). PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Curr. Drug. Metab.* 13: 105-119.
- Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C.(2001). Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmacol. Rev.* 53: 283-318.
- Moulton, H. M., Moulton, J. D.(2010). Morpholinos and their peptide conjugates: Therapeutic promise and challenge for Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* 1798: 2296-2303.
- Mäe, M., Andaloussi, S. El, Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H. J., Guterstam, P., Langel, Ü.(2009). A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J. Control.* 134(3): 221–227.
- Padari, K., Koppel, K., Lorents, A., Hallbrink, M., Mano, M., Pedroso De Lima, M., C., Pooga, M. (2010). S4(13)-PV cell-penetrating peptide forms nanoparticle-like structures to gain entry into cells. *Bioconjug Chem* 21: 774-83.
- Padari, K., Säälk, P., Hansen, M., Koppel, K., Raid, R., Langel, Ü., Pooga, M.(2005). Cell Transduction Pathways of Transportans. *Bioconjug. Chem.* 16: 1399-1410.

- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., Langel, Ü. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12(1): 67–77.
- Ramsay, E., Gumbleton, M. (2002). Polylysine and polyornithine gene transfer complexes: a study of complex stability and cellular uptake as a basis for their differential in-vitro transfection efficiency. *J Drug Target* 10: 1-9.
- Regberg, J., Srimanee, A., Erlandsson, M., Sillard, R., Dobchev, D. A., Karelson, M., Langel, Ü.(2014). Rational design of a series of novel amphipathic cell-penetrating peptides. *Int. J. Pharm.*464(1-2): 111-116.
- Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., Chernomordik, L. V. (2005). Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin-dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors. *J. Biol. Chem.* 280: 15300-15306.
- Rydström, A., Deshayes, S., Konate, K., Crombez, L., Padari, K., Boukhaddaoui, H., Aldrian, G., Pooga, M., Divita, G.(2011). Direct Translocation as Major Cellular Uptake for CADY Self-Assembling Peptide-Based Nanoparticles. *PLOS ONE* 6: e25924.
- Scholz, C. & Wagner, E. (2012). Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: common and different tasks for synthetic carriers. *J. Control.* 161(2): 554–565.
- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., Langel, U.(2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta* 1467(1): 165–176.
- Säälilik, P., Padari, K., Niinep, A., Lorents, A., Hansen, M., Jokitalo, E., Langel, Ü., Pooga, M.(2009). Protein Delivery with Transportans Is Mediated by Caveolae Rather Than Flotillin-Dependent Pathways. *Bioconj. Chem.* 20: 877-887.
- Tanaka, G., Nakase, I., Fukuda, Y., Masuda, R., Oishi, S., Shimura, K., Kawaguchi, Y., Takatani-Nakase, T., Langel, Ü., Gräslund, A., Okawa, K., Matsuoka, M., Fujii, N., Hatanaka, Y., Futaki, S.(2012). CXCR4 Stimulates Macropinocytosis: Implications for Cellular Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides and HIV. *Chem. Biol.* 19: 1437-1446.
- Touznik, A., Lee, J. J., Yokota, T.(2014). New developments in exon skipping and splice modulation therapies for neuromuscular diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 14: 809-819.
- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release : J. Control.* 151(3): 220–228.
- Veiman, K.-L., Mägi I., Ezzat K., Margus H., Lehto T., Langel K., Kurrikoff K., Arukuusk P., Suhorutšenko J., Padari K., Pooga M., Lehto T., Langel Ü.(2013). PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. *Mol. Pharm.* 10(1): 199–210.
- Veronese, F.M.(2001). Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 22(5): 405–417.
- Vivés, E., Brodin, P. & Lebleu, B.(1997). A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* 272(25): 16010–16017.
- Wang, W.; Li, W.; Ma, N.; Steinhoff, G.(2013). Non-viral gene delivery methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14(1): 46–60.

- Wilson, R. C., Doudna, J. A.(2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 42: 217-239.
- Yandek, L.E., Pokorny, A. & Almeida, P.F.F.(2009). Wasp mastoparans follow the same mechanism as the cell-penetrating peptide transportan 10. *Biochemistry* 48(30): 7342–7351.
- Yin, H., Lu, Q., Wood, M.(2008). Effective exon skipping and restoration of dystrophin expression by peptide nucleic acid antisense oligonucleotides in mdx mice. *Mol. Ther.* 16: 38-45.
- Yoo, J. W., Doshi, N., Mitragotri, S.(2011). Adaptive micro and nanoparticles: temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* 63: 1247-1256.
- Ziegler, A. (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv. Drug Delivery Rev.* 60(4-5): 580–597.

Tänuavaldused

Soovin siiralt tänada oma juhendajaid prof. Margus Poogat ning eriliselt Carmen Juksi nõu, aja, asjakohase kriitika, mõistva ja kannatliku suhtumise, ülima professionaalsuse ning piiritu heatahtlikkuse eest. Ühtlasi soovin tänada sõbralikke ja abivalmis laborikaaslasi. Tänan!

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Herman Proosa

(sünnikuupäev: 09.11.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „PepFectide nukleiinhapete nanokomplekside ultrastruktuuri kirjeldus transmissioonelektronmikroskoopiaga“, mille juhendajad on Carmen Juks ja Margus Pooga,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **05.26.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014